动 物 学 研 究 2012，Apr. 33(2): 203−210
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research
DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.02203

松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化

曾 珍, 刘至治*, 潘连德*, 唐文乔, 王 茜#, 耿云皓#

（上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306）

摘要：首先, 从 294 条 10 个碱基随机引物中, 筛选出 32 条多态性引物, 对富春江、黄河、滦河和鸭绿江等 4 个松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*)野生群体共 120 尾个体进行 RAPD 分析。结果表明, 松江鲈鱼野生群体的遗传多样性较丰富，其主要表现在：① 在扩增得到的 591 个位点中, 有 515 个(87.14%)位点呈现多态性，群体间多态位点比率(P)的大小顺序为：富春江群体 89.17%>黄河群体 87.99%>鸭绿江群体 86.63%>滦河群体 83.25%。② 松江鲈鱼群体间的 Shannon 信息指数(I_T)和 Nei's 遗传多样性指数(H_T)分别在 0.3393~0.3566 和 0.2157~0.2279 间, 滦河群体的值较其他 3 群体稍低；若作为一个整体, 则总的 Shannon 信息指数(I_T)和 Nei's 遗传多样性指数(H_T)分别为 0.3710±0.2153 和 0.2336±0.1643。③ 虽然群体间基因流值(N_m)在 5.76103～19.84497 间, 显示各地理群体间存在程度不同的基因交流, 但分子方差分析(AMOVA)结果却表明, 各群体间存在显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)的遗传分化。④ 聚类分析表明, 鸭绿江群体首先与黄河群体聚为一支, 再与富春江群体相聚, 最后与单独一支的滦河群体聚类, 表明鸭绿江、黄河、富春江等 3 群体间的遗传距离与彼此间的地理距离远近密切相关, 而滦河群体与它们的遗传距离较远。其次, 从获得的 $S_{1225}^{525\ bp}$、$S_{1225}^{605\ bp}$、$S_{1225}^{841\ bp}$、$S_{1345}^{695\ bp}$、$S_{1345}^{825\ bp}$ 等 5 个特异 RAPD 条带中, 成功地由 $S_{1225}^{605\ bp}$、$S_{1225}^{841\ bp}$ 条带分别转化出 $SCAR01^{560\ bp}$、$SCAR02^{443\ bp}$ 的 SCAR 标记。这两个标记的出现频率, 在鸭绿江群体最高(96.67%和 93.33%)、富春江群体其次(83.33%和 90%)、黄河群体再其次（56.67%和 66.67%)、滦河群体最低(13.33%和 20%)。因此, $SCAR01^{560\ bp}$、$SCAR02^{443\ bp}$ 可作为鉴别松江鲈鱼滦河群体与其他 3 群体的分子标记。

关键词：松江鲈鱼; 遗传多样性; RAPD; SCAR 标记
中图分类号：Q959.483; Q343 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)02-0203-08

Analysis of genetic diversity in wild populations of *Trachidermus fasciatus* by RAPD and the transformation of two SCAR markers

ZENG Zhen, LIU Zhi-Zhi*, PAN Lian-De*, TANG Wen-Qiao, WANG Qian#, GENG Yun-Hao#

(*Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Certificated by Ministry of Education*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: Firstly, RAPD was conducted to analyze genetic diversity of *Trachidermus fasciatus* in the Fuchun River population (FR), Yellow River population (YR), Luan River population (LR), and Yalu River population (YL), with 32 polymorphic 10-bp random primers selected from 294 ones. Thirty wild individuals were detected in each population. The results indicated that the genetic diversity of *T . fasciatus* was relatively rich. The major results were as the following: 1) Altogether, 591 bands were detected and 515 of them were polymorphic, accounted for 87.14%. The range of proportion of polymorphic loci (P) was: FR(89.17%)>YR(87.99%)>YL(86.63%)>LR(83.25%). 2) The Shannon's information index(I_T) and Nei's genetic diversity(H_T) among populations were 0.3393−0.3566 and 0.2157−0.2279, respectively. Compare to other three populations, LR population had relative lower values. If took the populations as a whole, the total Nei's genetic diversity(H_T) and Shannon's information index(I_T) was 0.2336±0.1643 and 0.3710±0.2153, respectively. 3) The value of gene flow (N_m) (5.76103−19.84497) were high, indicating certain gene exchange existed

收稿日期：2011-11-03；接受日期：2012-02-14
基金项目：上海市教育委员会重点学科(海洋生物学)建设项目(J50701); 上海市科技兴农项目(沪农科推字 2006-3-5); 上海市水生生物学重点学科建设项目(S30701); 上海市重点学科建设项目(Y1101)
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: zzliu@shou.edu.cn; ldpan@shou.edu.cn
#2007 生物科学(海洋生物方向本科生)
第一作者简介：曾珍(1987-), 女, 江西抚州人, 硕士研究生。专业方向为鱼类分子进化与免疫遗传学。E-mail:zengzhen2010@126.com

among the four populations. But the AMOVA results exhibited significantly differentiation (P<0.05 or P<0.01) among the populations. 4) In the UPGMA tree constructed according to genetic distance, YL and YR populations clustered firstly, then with FR population, and finally they joined to LR population. Obviously, the YL, YR and FR populations had relatively close relationship according to their geographic distance, whereas LR population showed clear divergence to the other three populations. Secondly, out of the five special RAPD bands ($S_{1225}^{525\ bp}$, $S_{1225}^{605\ bp}$, $S_{1225}^{841\ bp}$, $S_{1345}^{695\ bp}$ and $S_{1345}^{825\ bp}$), SCAR maker $SCAR01^{560\ bp}$ and $SCAR02^{443\ bp}$ were successfully transformed from $S_{1255}^{605\ bp}$ and $S_{1255}^{841\ bp}$, respectively. After large samples examination of the two markers, we found the highest frequency (96.67% and 93.33%) in the YL population, higher frequency (83.33% and 90%) in the FR population, high frequency (56.67% and 66.67%) in the YR population, and the lowest frequency (13.33% and 20 %) in the LR population. Therefore, $SCAR01^{560\ bp}$ and $SCAR02^{443\ bp}$ can be used as special molecular markers for the population identification between LR and other three populations.

Key words: *Trachidermus fasciatus*; Genetic diversity; RAPD; SCAR marker

松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*, Heckel)隶属于鲉形目(Scorpaeniformes)杜父鱼科(Cottidae)松江鲈鱼属(*Trachidermus*), 俗称“四鳃鲈”等, 是一种降海溯河洄游性鱼类(Hubei Institute of Hydrobiology Laboratory of Ichthyology, 1976)。它个体不大, 但自古被誉为佳品, 其分布曾被认为仅局限于长江口咸淡水域及附近小河中(Hubei Institute of Hydrobiology Laboratory of Ichthyology, 1976); 不过, 最近 Wang (2006)报道, 该鱼从日本南部、朝鲜西南部到中国东部沿海及相邻淡水水域都有分布。在中国, 随着经济的发展, 因气候变化、环境污染及水利设施的修建等诸多因素的影响, 松江鲈鱼资源日益枯竭、种群濒危, 已于 1988 年被列为国家二级保护动物 (Wang & Liang,2008)。进入 21 世纪以来, 先后有研究者从形态、生化遗传到分子水平上对松江鲈鱼的种质资源进行了分析(Liu et al, 2010; Wang et al, 2001, 2002; Wang & Liang, 2008; Xu et al, 2008, 2009), 但这些报道受限于野生个体难觅等原因, 研究结果尚难以全面、客观地反映中国现有松江鲈鱼野生种群的遗传多样性现状; 另一方面, 关于松江鲈鱼种群分化问题, 研究者的观点也不尽一致(Liu et al, 2010; Wang et al, 2001, 2002; Wang & Liang,2008; Xu et al, 2008, 2009)。因此, 采用其他分子标记方法, 从不同侧面进一步探讨这些问题十分必要。

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术是由 Wiliams et al(1990)和 Welsh et al(1990)提出的一种具有简单、快速、高效等特点的分子标记, 已被广泛地应用于生物的亲缘关系、遗传多样性、群体遗传、种质鉴定等多方面的研究(Barman et al, 2003; Gao et al, 2007; Yan et al, 2005)。序列特定扩增区域标记(sequence characterized applied region, SCAR)是在 RAPD 技术基础上发展起来的一种可靠、稳定、可长期利用的标记技术, 因其具有稳定性好、重现性高等特点, 已被国内外研究者广泛应用于大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Zhang et al, 2007)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (Zou et al, 2005)、“新吉富”尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Li et al, 2010)、瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)(Lu et al, 2011)、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)(Gao et al, 2008)等许多水产动物的群体间特异性分子标记或品系鉴别。本研究采用 RAPD-SCAR 分析方法, 既从核基因组角度分析松江鲈鱼的群体遗传多样性, 又力求寻找地理群体间的分子标记, 为松江鲈鱼种质资源的保护与利用、种群鉴别提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的野生松江鲈鱼样本, 分别采自浙江富春江(简称富春江群体, 用 FR 表示)、山东黄河入海口(简称黄河群体, 用 YR 表示)、河北滦河(简称滦河群体, 用 LR 表示)、辽宁鸭绿江(简称鸭绿江群体, 用 YL 表示)。每个群体均采集活鱼 30～40 尾, 剪取约 0.2 g 右胸鳍, 放入 1.5 mL 离心管中, 先用 95%酒精保存 48 h 后, 换用 75%酒精保存于 4 ℃冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用常规的“酚-氯仿”法, 参照文献(Liu et al, 2009)的方法进行。提取的 DNA 于−20 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 RAPD-PCR 扩增 10 碱基随机引物 294 条(引物编号为 S11-S40、S122-S185、S1210-S1409), 购

自上海生工生物工程技术服务有限公司。参照说明书配置浓度 5 μmol/L, −20 ℃冰箱保存备用。PCR 反应体系 25 μL：包括含 2.5 μL buffer、1 μL dNTPs (2.5 μmol/L), 引物 2 μL、2μL 基因组 DNA、0.6 μL *Taq* DNA 聚合酶(北京艾德莱生物科技有限公司, 5 U/μL)、16.9 μL 去离子水(天根生化有限公司)。反应条件为：94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 45 s、36 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 90 s, 45 个循环后, 72 ℃延伸 10 min。所有 PCR 反应均在 Mastercycler ep gradient S (Eppendorf)型 PCR 仪上进行。取 10 μL PCR 扩增产物, 经凝胶(含 EB 0.5 μg/mL)电泳(5 V/cm)1.5 h 后, 用 BIO-RAD Gel Doc XR 凝胶成像系统拍照和分析。

1.2.3　数据分析　经电泳获得的 RAPD 图谱, 在同一电泳迁移位置上, 有 RAPD 扩增条带的计为 1, 没有的计为 0, 将每群体所有个体在全部位点上的谱带式样组成一个“0 或 1”矩阵。在假定 Hardy-Weinberg 平衡下, 用 POPGENE 32 软件进行分析, 计算多态位点数、多态位点比例(P)、Nei’s 遗传多样性指数(H_T)、Shannon 信息指数(I_T)、群体间遗传相似度及群体间遗传距离等。根据群体间的遗传距离, 用 MEGA4.0 (Tamura et al, 2007)软件包中的“UPGMA”程序对 4 个群体进行聚类分析, 用 Arlequin 3.0(Excoffier et al, 2005) 软件进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA), 计算遗传分化指数(F_{st})。

1.2.4　RAPD 产物的克隆　利用 DNA 快速回收试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司), 从 1.8%琼脂糖凝胶中回收纯化 RAPD 特异片段。将纯化片段连接到pMD19-T Vector载体(TaKaRa 公司), 然后转化入 TOP10 感受态细胞(天根生化有限公司)。根据蓝白斑原理, 挑选白色菌落进行摇菌, 用 M13+/-引物做菌落 PCR、筛选鉴定阳性克隆, 每个个体挑选 3 个阳性克隆进行测序(上海美吉生物医药有限公司)。

1.2.5　SCAR 标记的筛选　将 RAPD 扩增产生的特异性条带回收并克隆、测序。根据测序结果, 用 Primer Premier3.0(Rozen & Skaletsky, 2000)软件设计 19～25 bp 的正反引物, 先经小样本(每群体 8 个体)PCR 筛选, 对仍能扩增出目的条带的引物再进行大样本(每群体 30 个体)验证。PCR 扩增参数基本与 RAPD 分析保持一致, 但退火温度稍做变动(表 1)、循环次数减为 35 个。

2　结　果

2.1　RAPD 扩增结果

本研究从 294 条 10 碱基随机引物中, 筛选出 32 条扩增结果稳定、重复性好的引物(图 1), 对 4 个松江鲈鱼群体进行 RAPD 分析。获得的总位点数

表 1　SCAR 标记的引物序列、退火温度及扩增片段大小

Tab. 1　Primer sequence, annealing temperature and size of PCR band of SCAR markers

RAPD 引物 RAPD primer	RAPD 标记带 RAPD marker	引物序列 Primer sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature (℃)	扩增片段 Size of PCR Band (bp)	SCAR 标记 SCAR marker
S1255	605	F: CAAGTCCGCTACCTGTAATGTCCG R: CGTTATGCTGATGTTCTCCTCCCTC	64	560	SCAR01$^{560\ \mathrm{bp}}$
	841	F: CATCCTAACCATCAACAGCCAATC R: CTACCCACGGCACCTTTCCA	64.4	443	SCAR02$^{443\ \mathrm{bp}}$

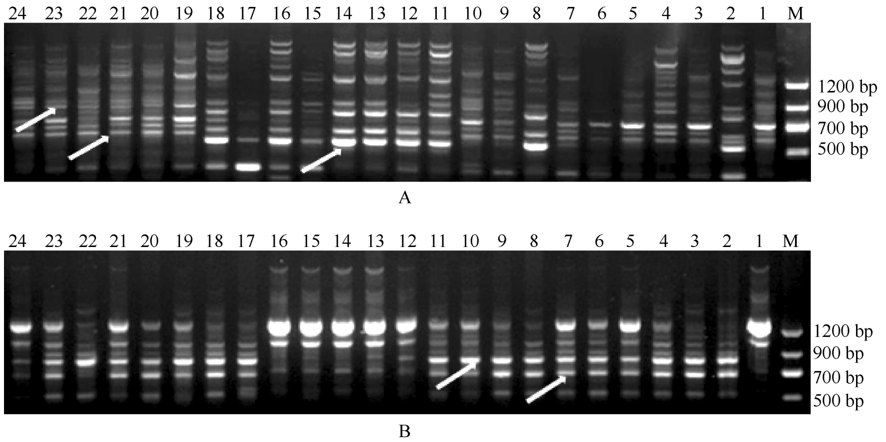

图 1　引物 S_{1255}(A)和 S_{1345}(B)的扩增结果

Fig. 1　The amplification results of primer S_{1255} (A) and S_{1345}(B)

M:Marker;1～6:FR 群体(FR population); 7～12:YR 群体(YR population); 13～18:LR 群体(LR population); 19～24:YL 群体(YL population); 箭头所指为特异性条带(Arrows directed the specific bands)。

为 591 个，其中多态位点数 515 个(87.14%)，平均每条引物产生 18.46 个位点，扩增片段大小集中在 200～2 500 bp 间。松江鲈鱼群体间的多态性位点比例(P)的大小顺序为：富春江群体(FR)89.17%>黄河群体(YR)87.99%>鸭绿江群体(YL)86.63%>滦河群体(LR)83.25%。

在 4 群体间，共获得 5 条特异性 RAPD 扩增带(图 1A，B，箭头所指)。其中，引物 S_{1255} 有 3 条特异性带：条带 $S_{1255}^{525\ bp}$ 在 FR、YL 两群体的出现率很低，仅 6.67%，即只有 2 个体检测到此位点，而在 YR、LR 群体却较高，分别为 23.33%、76.67%；与此相反，条带 $S_{1255}^{605\ bp}$ 在 FR、YL 两群体的出现率(90%、93.33%)最高，而在 YR 群体为 73.33%、在 LR 群体仅 13.33%；条带 $S_{1255}^{841\ bp}$ 在 4 群体间的出现频率与 $S_{1255}^{605\ bp}$ 类似，大小顺序为：YL (96.67%)>FR (90%)>YR (83.33%)>LR（13.33%）。引物 S_{1345} 有 2 条特异性带：$S_{1345}^{695\ bp}$ 和 $S_{1345}^{825\ bp}$，其出现率在 YL 群体均为 100%，在 FR 和 YR 两群体均为 93.33%，而在 LR 群体中却只有 16.67%。

2.2　群体遗传多样性与遗传分化

4 个松江鲈鱼群体间的 Shannon 信息指数(I_T)、Nei's 遗传多样性指数(H_T)分别在 0.3393~0.3566 和 0.2157~0.2279 间(表 2)。比较而言，LR 群体的值较其它 3 群体稍低。若将 4 群体看成一个整体，则总群体的 Shannon 信息指数(I_T)、Nei's 遗传多样性指数(H_T)分别为 0.3710±0.2153、0.2336±0.1643。可见，松江鲈鱼群体的基因多样性较高。

表 2　松江鲈鱼群体的 Shannon 信息指数(I_T)和 Nei' s 遗传多样性指数(H_T)

Tab. 2　Shannon's information index (I_T)and the Nei' s genetic diversity (H_T) in the populations of *Trachidermus fasciatus*

群　体 Population	I_T	H_T
FR	0.3560±0.2308	0.2259±0.171
YR	0.3566±0.2380	0.2279±0.1768
LR	0.3393±0.2382	0.2157±0.1727
YL	0.3438±0.2365	0.2183±0.1743

分子方差分析(AMOVA)结果表明(表 3)，在遗传变异的总方差中，仅 4.63%的差异来自群体间，而 95.37%的差异存在于群体内个体间。4 群体总遗传分化指数(F_{st})为 0.0463。由表 4 可知，群体间的 F_{st} 值在 0.02458~0.07986 间，其中 LR 群体与 FR、YL、YR 群体的 F_{st} 值都较大, YR、YL 群体间的 F_{st} 值最小(0.02458)，群体间存在显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)的遗传分化。不过，由基因流值(N_m)的大小可知，各地理群体间均存在一定程度的基因交流，其中 YR、YL 群体间的 N_m 最强(19.84497)，而 FR、LR 群体 N_m 最弱(5.76103)(表 4)。

表 3　松江鲈鱼群体间遗传差异的 AMOVA 分析

Tab. 3　AMOVA analyses in the populations of *Trachidermus fasciatus*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	总方差 Sum of squares	变异组成 Variance components	变异百分比 Percentage of variance (%)
群体间 Among populations	3	481.200	3.1693	4.63
群体内 Within population	116	7577.333	65.3218	95.37
总计 Total	119	8058.533	68.4911	100

表 4　松江鲈鱼群体间基因交流值(N_m，对角线上方)与遗传分化指数 (F_{st}，对角线下方)

Tab. 4　The value of gene flow (N_m,above diagonal) and Genetic differentiation index (F_{st},below diagonal) among the four populations of *Trachidermus fasciatus*

群体 Population	FR	YR	LR	YL
FR		12.38578	5.76103	16.27473
YR	0.03880(P<0.01)		10.98051	19.84497
LR	0.07986(P<0.01)	0.04355(P<0.01)		7.97009
YL	0.02981(P<0.01)	0.02458(0.01<P<0.05)	0.05903(P<0.01)	

2.3　聚类分析

YR 和 YL 群体间的遗传相似度最大而遗传距离最小，分别为 0.9919 和 0.0082；相反，FR 和 LR 群体间的遗传相似度最小而遗传距离最大，分别为

0.9757 和 0.0246(表 5)。根据遗传距离进行聚类分析表明, YL 群体与 YR 群体首先聚为一支，然后与 FR 群体聚类，最后与单独为一支的 LR 群体相聚(图 2)。显然, LR 群体与其他 3 个群体间的遗传距离较远，而 YL、YR、FR 群体间的亲缘关系与彼此间地理距离的远近密切相关。

表 5　群体间的遗传相似度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab. 5　Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) within or among populations of *Trachidermus fasciatus*

群体 Population	FR	YR	LR	YL
FR		0.9862	0.9757	0.9886
YR	0.0139		0.9850	0.9919
LR	0.0246	0.0151		0.9814
YL	0.0115	0.0082	0.0188	

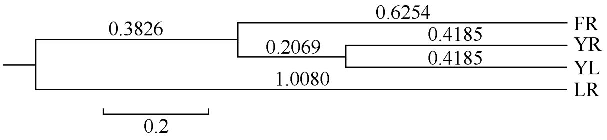

图 2　基于遗传距离的 4 个松江鲈鱼群体间的 UPGMA 聚类分析

Fig. 2　Dendrogram o f the four populations of *Trachidermus fasciatus* by UPGMA based on genetic distance

2.4　特异性 RAPD 条带的克隆、测序及 SCAR 标记的建立与验证

对 5 个特异性 RAPD 条带进行测序后发现，它们的大小分别为 520、600、840、690 和 820 bp 左右，与 RAPD 扩增的条带大小基本一致(图 1)，表明得到的序列是真实的目的片段。在这 5 个特异性条带上成功设计了 5 对 SCAR 标记引物， 但经小样本 PCR 验证后发现，只有 $S_{1255}^{605\ bp}$ 和 $S_{1255}^{841\ bp}$ (GenBank 序列号：JN714551、JN714552)仍能扩增出特异性目的片段(表 1，图 3)，其余 3 个标记(序列未上传)的特异性消失。又因考虑引物中 G、C 碱基的含量，特异性引物的上、下游位置未从序列的两端开始，而是移向了序列的中间部分，故所得的 SCAR 标记 SCAR01$^{560\ bp}$、SCAR02$^{443\ bp}$ 的长度分别要比对应的 RAPD 标记短(表 1，图 3)。接着，为进一步检测 SCAR 标记的有效性，在松江鲈鱼 4 群体共 120 尾个体中进行大样本验证。结果表明，SCAR01$^{560\ bp}$ 标记在 FR、YR 和 YL 群体的出现频率分别高达 83.33%(25/30)、56.67%(17/30)及 96.67%(29/30)；而在 LR 群体的 30 个体中，仅 4 尾具有此标记，出现频率很低(13.33%)。同样，SCAR02$^{443\ bp}$ 标记在 FR、YL 两群体的出现频率也很高，分别为 90%(27/30)和 93.33%(28/30)；在 YR 群体的出现频率也较高，为 66.67%(20/30)；但在 LR 群体出现的频率比较低，仅 20%(6/30)。可见，SCAR01$^{560\ bp}$ 和 SCAR02$^{443\ bp}$ 可作为鉴别松江鲈鱼 LR 群体与其他 3 群体的特异性分子标记。

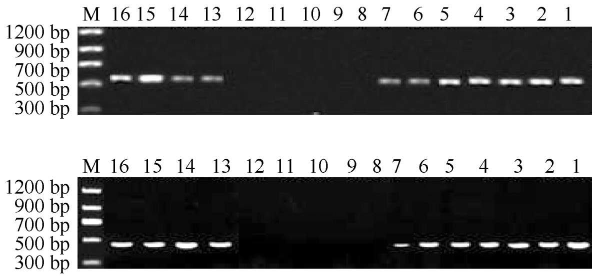

图 3　$S_{1255}^{605\ bp}$ 和 $S_{1255}^{841\ bp}$ 片段的 SCAR 转化

Fig. 3　SCAR bands from $S_{1255}^{605\ bp}$ and $S_{1255}^{841\ bp}$ markers

A: SCAR01$^{560\ bp}$; B: SCAR02$^{443\ bp}$。 M:Marker;1～4:FR 群体(FR population); 5～8:YR 群体(YR population); 9～12:LR 群体(LR population); 13～16:YL 群体(YL population)。

3　讨　论

3.1　松江鲈鱼群体遗传多样性与种群遗传结构

现代遗传学的观点认为，遗传多样性的高低与一个物种的适应能力、生存能力及进化潜能密切相关。遗传多样性的下降，可能导致物种对环境适应能力的降低(Liu et al, 2009; Vrijenhoek,1994)。因此，了解濒危物种的群体遗传多样性，对其保护与管理策略的制定具有重要意义。关于松江鲈鱼群体遗传多样性，先后有过一些生化遗传、分子遗传等方面的报道。同工酶的分析结果表明，鸭绿江流域天然种群的多态位点比例(10%)和平均杂合度(0.03)，在鱼类中均低于平均值(Wang et al, 2002); Xu et al (2009)通过 ISSR 技术，发现松江鲈鱼丹东、秦皇岛群体的多态位点比例(44%)等遗传指标均较低。而 Liu et al (2010)通过线粒体控制区序列的多态性分析发现，松江鲈鱼丹东、盘锦、秦皇岛群体的单倍型多样指数(H_d)维持在一个较高水平(0.989～1.00)。这些结论的不一致，可能与作者所用同工酶多态位点 (2 个)、ISSR 多态性引物数量(4 个)及群体样本数量(6～15 尾个体)偏少有关。本研究借助 RAPD 技术，使用 32 个多态性 10 碱基随机引物，从整个基因组水平上，对分布于较大地理范围里的 4 个松

江鲈鱼地理种群共 120 个体(每群体 30 尾样本)进行分析，结果表明，鸭绿江群体(YL)与黄河群体(YR)、富春江群体(FR)的多态位点比例(*P*)在 86.63%～89.17%间，只滦河群体(LR)略低 (83.25%)。这些值虽低于野生大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*, 93.02%~96.35%, Liu et al, 2009)、野生小黄鱼(*Larimichthys polyactis*, 91.03%, Han et al, 2007)，但高于半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Güntuer, 76%~80%, Han et al, 2007)。故此，我们认为野生松江鲈鱼的遗传多样性尚较丰富。

种群遗传结构是指遗传多样性在群内、群间的分布，即遗传分化。种群遗传结构可反映种群大小、繁育系统、隔离程度和迁徙格局的时空动态。分化是种群偏离共同祖先所经历的进化过程，反映了种群间遗传差异的大小和距离的远近。环境为种群分化提供了特定场所，自然选择使分化得以实现(Tang et al, 2011)。关于松江鲈鱼种群分化问题，先后有些零星的报道。从表型性状上看，Wang et al (2008)发现，松江鲈鱼鸭绿江、青龙河和富春江等 3 个群体的分化虽未达到亚种水平，但鸭绿江群体与其它两个群体的差异较大。在分子水平上, AFLP 和 ISSR(Xu et al, 2008; 2009)的分析结果表明，松江鲈鱼丹东群体、秦皇岛群体间的分化不明显。相反，线粒体 D-Loop 区的序列分析结果则显示，这两个群体间存在显著的遗传分化(F_{st}=0.1422, P<0.05)，而盘锦群体与它们间的分化却不明显(P>0.01) (Liu et al, 2010)。上述观点的不尽一致，应与研究者所采用分析方法灵敏度的不一、样本数量多少不等及采样群体地理位置的远近等等有关。

本研究发现，虽然松江鲈鱼 4 个地理群体间的 F_{st} 值(0.02～0.08 间)不是很大，但这些群体间却都存在显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)的遗传分化，特别是 LR 与 YL、LR 与 FR 群体间的 F_{st} 值(0.05903 和 0.07986)较大，揭示滦河群体与鸭绿江、富春江群体间的分化已达到 Wright (1978)标准的中等程度。这一结果与 Wang et al (2008)的形态研究结果相符，也与 Liu et al (2010)报道的线粒体分析结果部分的一致。不过需要指出的是，本研究的 4 个群体间的基因交流值(N_m=5～20>4)都比较大，特别是 YL、YR、FR 群体间的基因交流值更大(12～20)，表明它们间的基因交流较为频繁，这可能掩盖了各群体间固有的部分遗传差异，从而影响了彼此间遗传分化指数的大小。松江鲈鱼繁殖期间及其幼鱼在近海岸生长阶段，季节性海洋沿岸流增加了不同地理种群间的混杂与基因交流的机会，特别是地理位置相对较近、同属于黄海海区的 YR 和 YL 群体，这种交流更易发生。

在 UPGMA 聚类图中(图 2), YL、YR、FR 群体间的关系与彼此地理位置的远近相一致，呈现出从北到南的分布格局，而 LR 群体与它们的亲缘关系都较远，显示出明显的遗传差异。

3.2 SCAR 标记的应用

由特异性的 RAPD 条带转化而来的 SCAR 标记，克服了 RAPD 重复性欠佳的弱点，已被广泛应用于分子标记辅助育种、种质鉴定等方面(Li et al, 2010; Lu et al, 2011; Zou et al, 2005)。本研究由 $S_{1255}^{605\ bp}$ 和 $S_{1255}^{841\ bp}$ 两条 RAPD 特异性条带成功转化出 SCAR01$^{560\ bp}$和 SCAR02$^{443\ bp}$的 SCAR 标记。大样本检测表明，它们的出现频率在 YL、FR 群体都很高(83%~97%)，在 YR 群体比较高(56%～67%)，而在 LR 群体却很低(13%～20%)。因此, SCAR01$^{560\ bp}$和 SCAR02$^{443\ bp}$可作为鉴别滦河群体与其他 3 群体的分子标记。至于这两个标记与什么性状相关联，有待以后的研究来证实。有趣的是，在每群体的 30 尾样本中, YL、FR 群体未出现这两个标记的样本数(1～2 和 3～5 个)，恰与 LR 群体出现这两个标记的样本数(4～6 个)接近。若假设这些个体恰好在 3 群体间发生了互换，则 YL、FR 群体出现与 LR 群体不出现标记的频率几乎达到 100%。LR 群体的养殖性能较其他海区的差(Pan et al, 2010)，在 4 群体中的遗传多样性最低、UPGMA 聚类树中与其他群体的关系最远等，都揭示该群体具有自身的遗传结构特点，推测渤海湾海区内可能存在松江鲈鱼的独立产卵场，值得深入调查。

本研究的另外 3 个 RAPD 标记，经克隆、测序后，虽曾设计多对引物进行验证，但都未能成功转化为 SCAR 标记。类似的现象在鲤(Gao et al, 2007)、团头鲂(Zou et al, 2005)、奥利亚罗非鱼(Gao et al, 2008)的 SCAR 标记转化中都存在。究其原因可能是：(1)$S_{1255}^{525\ bp}$、$S_{1345}^{695\ bp}$和 $S_{1345}^{825\ bp}$片段在基因组中可能是高度重复序列，在转化为 SCAR 标记时特异性消失；(2)若产生 RAPD 特异性位点发生在随机引物的退火区，用随机引物进行 RAPD 扩增时发生错配，退火不良而不能扩增，而随机引物 3'端增加了 9～15 个碱基后，在非特异性区提供了足够的同源性，克服了最初的错配允许引物退火扩增，

使原有的特异性消失(Gao et al, 2007; Xu et al, 1995); (3)也可能是特异 RAPD 带位于引物的 3'端或者与基因的遗传距离较远, 连锁不紧密造成的(Gao et al, 2007)。

接下来, 我们将着力寻找 YL、YR、FR 群体间的特异性分子标记, 为松江鲈鱼天然种质资源库的保护提供分子水平上的鉴定手段。

致谢：辽宁省水产苗种管理局检疫检测中心唐作鹏研究员、丹东市水产技术推广站梁天红高级工程师、山东省垦利县周辉先生和浙江省杭州市金良庭先生协助采集松江鲈鱼样品, 上海海洋大学王成辉教授和本校水产与生命学院的 2009 级李雪松、马召腾帮助处理数据, 在此一并致谢。

参考文献：

Barman HK, Barat A, Yadav BM, Banerjee S, Meher PK, Reddy PVGK, Jana RK. 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay[J]. *Aquaculture*, **213**(1-4): 115-123.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evol Bioinform*, **1**: 47-50.

Gao FY, Ye X, Lu WX, Huang ZH, Zhang T. 2008. RAPD analysis and SCAR transformation of three populations of *Oreochromis aureus*[J]. *J Shanghai Fish Univ*, **17**(1): 22-27. [高风英, 叶星, 卢迈新, 黄樟翰, 张庭. 2008. 3 个奥利亚罗非鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J]. 上海水产大学学报, **17**(1): 22-27.]

Gao JS, Sun XW, Liang LQ. 2007. Conversion of RAPD markers linked to cold tolerance to SCAR markers in common carp[J]. *J Dalian Fish Univ*, **22**(3): 194-197. [高俊生, 孙效文, 梁利群. 2007. 鲤抗寒性状的 RAPD 标记转化为 SCAR 标记的研究[J]. 大连水产学院学报, **22**(3): 194-197.]

Han ZQ, Zhuang ZM, Gao TX, Liu JX, Li YH, Wang ZY, Tang QS. 2007. Genetic diversity in *Cynoglossus semilaevis* by AFLP, RAPD and mtDNA markers[J]. *J Fish Sci Chn*, **14**(2): 192-200. [韩志强, 庄志猛, 高天翔, 刘进贤, 李玉晖, 王志勇, 唐启升. 2007. 半滑舌鳎DNA的群体遗传变异[J]. 中国水产科学, **14**(2): 192-200.]

Hubei Institute of Hydrobiology Laboratory of Ichthyology. 1976. Fishes in Yangtze River[M]. Beijing: Science Press, 214-215. [湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 1976. 长江鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 214-215.]

Li SF, Tang SJ, Cai WQ. 2010. RAPD-SCAR markers for genetically improved NEW GIFT Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus* L.) and their application in strain identification[J]. *Zool Res*, **31**(2): 147-153. [李思发, 唐首杰, 蔡完其. 2010. 遗传改良“新吉富” (NEW GIFT) 尼罗罗非鱼 RAPD-SCAR 标记开发及其在品系鉴别中的应用[J]. 动物学研究, **31**(2): 147-153.]

Liu HL, Zhang Q, Tang YL, Yu FY, Zhou JY. 2010. Structure and genetic diversity of mtDNA D-Loop sequences among *Trachidermus fasciatus* stocks in Yellow Sea and Bohai Sea of China[J]. *Mar Sci Bull*, **29**(3): 283-288. [刘海林, 章群, 唐优良, 余帆洋, 周佳怡. 2010. 黄渤海松江鲈鱼线粒体控制区结构与序列多态性分析[J]. 海洋通报, **29**(3): 283-288.]

Liu ZZ, Yang JQ, Wang ZQ, Tang WQ. 2009. Genetic structure and population history of *Beleophthalmus petinirostris* in Yangtze River Estuary and its Southern Adjacent Regions[J]. *Zool Res*, **30**(1): 1-10. [刘至治, 杨金权, 王正琦, 唐文乔. 2009. 长江口及其南部邻近地区大弹涂鱼种群遗传结构及种群历史分析[J]. 动物学研究, **30**(1): 1-10.]

Lu YP, Hu ZH, Wang CH, Xiang SP, Su XP, Yao ZL, Wang KW. 2011. SRAP and SCAR molecular marker related to body color of “whole red” patterns of *Cyprinus carpio var*. color[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **35**(1): 45-50. [吕耀平, 胡则辉, 王成辉, 项松平, 苏小平, 姚子亮, 王凯伟. 2011. 与“全红”瓯江彩鲤体色相关的 SRAP 及 SCAR 分子标记[J]. 水生生物学报, **35**(1): 45-50.]

Pan LD, Cai F, Ma ZT, Jiang X. 2010. The resources conservation and population features of *Trachidermus fasciatus* of China[J]. *Fish Sci Technol Inform*, **37**(5): 211-215. [潘连德, 蔡飞, 马召腾, 蒋鑫. 2010. 中国境内松江鲈鱼的种群特征以及资源保护[J]. 水产科技情报, **37**(5): 211-215.]

Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for generalusers and for biologist programmers[M] // Krawetz S, Misener S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press, 365-386.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.

Tang SJ, Li SF, Cai WQ. 2011. Mitochondrial DNA analysis on genetic variation of wild, domesticated, and genetically selected populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *J Fish Sci Chn*, **18**(3): 1-10. [唐首杰, 李思发, 蔡完其. 2011. 团头鲂野生、驯养、选育 3 类遗传生态群体遗传变异的线粒体 DNA 分析[J]. 中国水产科学, **18**(3): 1-10.]

Vrijenhoek RC.1994. Genetic diversity and fitness in small populations[M] // Loeschcke V, Tomiuk J, Jian S K, eds. Conservation Genetics. Basel: Birkhäuser, 37-53.

Wang JQ, Cheng G, Tang ZP. 2001. The distribution of Roughskin Sculpin (Trachidermus fasciatus Heckel) in Yalu River Basin, China[J]. *J Fudan Univ*: *Nat Sci*, **40**(5): 471-475. [王金秋, 成功, 唐作鹏. 2001. 鸭绿江流域中国境内松江鲈的分布[J]. 复旦学报: 自然科学版, **40**(5): 471-475.]

Wang JQ, Liang HZ. 2008. Populations identification in morphology of roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* in China[J]. *Ocean Limnol Sin*, **39**(4): 348-353. [王金秋, 梁鸿子. 2008. 基于形态性状的松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*) 种群鉴别[J]. 海洋与湖沼, **39**(4): 348-353.]

Wang JQ, Shi C, Cheng G. 2002. Isozyme analysis for a wild population of Roughskin Sculpin, *Trachidermus fasciatus*, from the Yalu River Basin in China[J]. *J Fudan Univ*: *Nat Sci*, **41**(6): 688-693. [王金秋, 石椿, 成功. 2002. 鸭绿江流域中国境内松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*) 天然种群的同工酶分析[J]. 复旦学报: 自然科学版, **41**(6): 688-693.]

Wang YH. 2006. Notes on the scientific name, type-locality and geographical distribution of roughskin sculpin (*Trachidermis fasciatus* Heckel,1840)[J]. *Mar Fish*, **28**(4): 299-303. [王幼槐. 2006. 关于淞江鲈学名和模式产地以及地理分布之探讨[J]. 海洋渔业, **28**(4):

299-303.]

Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, **18**(24): 7213-7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, **18**(22): 6531-6535.

Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4: Variabilty Within and Among Natural Populations[M]. Chicago: University of Chicago Press.

Xu H, Wilson DJ, Arulsekar S, Bakalinsky AT. 1995. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, **120**(5): 714-720.

Xu JR, Han XL, Li N, Xu P, Bao ZM. 2008. Analysis of genetic diversity in roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* by AFLP markers[J]. *J Dalian Fish Univ*, **23**(6): 437-441.[徐建荣, 韩晓磊, 李宁, 许璞, 包振民. 2008. 松江鲈群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 大连水产学院学报, **23**(6): 437-441.]

Xu JR, Han XL, Yu JF, Bao F, Xu P. 2009. Analysis of genetic diversity of Trachidermus fasciatus by ISSR[J]. *Freshwat Fish*, **39**(1): 21-24. [徐建荣, 韩晓磊, 郁建锋, 鲍峰, 许璞. 2009. 松江鲈群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 淡水渔业, **39**(1): 21-24.]

Yan JP, Liu SJ, Sun YD, Zhang C, Luo KK, Liu Y. 2005. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*)× common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, **234**(1-4): 49-60.

Zhang JB, Wang HJ, Cai ZP. 2007. The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Food Control*, **18**(6): 672-676.

Zou SM, Li SF, Cai WQ. 2005. SCAR transformation of a RAPD marker in blunt snout bream “Pujiang No. 1”[J]. *J Fish Chn*, **29**(3): 296-299. [邹曙明, 李思发, 蔡完其. 2005. 团头鲂 “浦江 1 号”一个 RAPD 标记的 SCAR 转化[J]. 水产学报, **29**(3): 296-299.]

~ ~

上海海洋大学海洋生物系统和神经科学研究所简介

上海海洋大学海洋生物系统和神经科学研究所是在上海水产大学更名为上海海洋大学的背景下，旨在为开辟一条新的基础理论与应用学科能“一对一”直接合作的通道，是由来自美国马里兰大学的特聘教授宋佳坤博士于2007年11月创立的，是一个开放式多学科交叉的研究平台。目前，本所主要以多种鱼类为研究对象，应用形态解剖，电生理和分子生物学等多种技术，对鱼类特殊感觉器官的形态结构、功能、进化发育和再生，以及对环境生态的适应机制进行深入研究，进而为它们在仿生学和各种不同应用领域，有机地提供理论基础。

首任所长宋佳坤教授毕业于上海水产学院（本校前身）海水养殖专业；1980年由朱元鼎院长和中科院动物所郑作新教授推荐，被美国密执安大学（University of Michigan，Ann Arbor）录取并获奖学金（属中科院自费公派留学），主修比较神经生物学和鱼类学。宋佳坤教授长期从事鱼类进化形态学与比较神经生物学研究，为表彰其在“脑神经个体与系统发育理论上的独特见解和贡献，以及在鱼类侧线与侧线神系统的新发现”于1992年荣获美国先进科学协会的荣誉会员（AAAS Fellow）。

目前，该团队拥有教师5名，其中教授2人，讲师2人，是一支以中青年和具有海外留学经历的教师为主的创新型团队。该团队拥有博士后1名、研究生17名，并与国内外多所著名大学和研究所建立了实质性的合作和交流。该所成立以来，在学校及学院的支持下，科研条件得到迅速发展，目前已拥有设备较齐全的分子生物实验室、细胞培养室和完善的斑马鱼和其他各类鱼的饲养房以及较为先进的显微摄影（包括荧光）和显微注射设备、神经显微手术和解剖、神经电生理和鱼类行为与听觉、电感受等测试记录分析设备的实验室。并能分享使用生命学院的扫描电镜等大型仪器。目前，主持国家自然科学基金项目、上海市科委重点项目和973前期项目各1项。已在 *Integrative Zoology* 上发表本所成立大会论文集1本， SCI 论文6篇，国内核心期刊论文8篇，并获得授权专利和实用新型专利各1项。

宋佳坤，严继舟，范纯新，王晓杰，郭弘艺

（上海海洋大学 海洋生物系统和神经科学研究所，上海 201306）